

Title	c-kit Gene Is Expressed by Skin Mast Cells in Embryos But Not in Puppies of Wsh/Wsh Mice : Age-Dependent Abolishment of c-kit Gene Expression
Author(s)	山崎, 大
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39031
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	やま ざき まさる 山 崎 大
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 5 4 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 9 月 3 0 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	c-kit Gene Is Expressed by Skin Mast Cells in Embryos But Not in Puppies of W^{sh}/W^{sh} Mice : Age - Dependent Abolishment of c-kit Gene Expression (c-kit 遺伝子は W^{sh}/W^{sh} 胎仔の皮膚マスト細胞には発現してい るが, W^{sh}/W^{sh} 仔マウスの皮膚マスト細胞においては発現してい ない : 加齢にともなう c-kit 遺伝子発現の消失)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 北村 幸彦 (副査) 教 授 西宗 義武 教 授 青笹 克之

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

マウスの W^{sh} 突然変異は c-kit レセプターをコードする W 遺伝子座の突然変異であるが c-kit 遺伝子のアミノ酸をコードする領域には異常を認めない。W 遺伝子座に2個の突然変異をもつマウスのほとんどがメラノサイト欠損、貧血、マスト細胞欠損、生殖細胞欠損という4種類の細胞の分化異常を示すのに対し、 W^{sh}/W^{sh} マウスにおいてはメラノサイトとマスト細胞は欠損するものの貧血、生殖細胞欠損という症状は示さない。 W^{sh}/W^{sh} マウスの小脳、脾臓、精巣においては c-kit mRNA の発現は認められるが、 W^{sh}/W^{sh} マウスから樹立した培養マスト細胞では c-kit mRNA の発現はまったく認められない。すなわち W^{sh} 突然変異は細胞種に特異的に作用して c-kit 遺伝子の転写を調節する制御領域の異常であると推測された。この異常に加え W^{sh}/W^{sh} マウスのマスト細胞欠損症は加齢とともに重篤となる。本研究の目的は種々の年齢における W^{sh}/W^{sh} マウスの皮膚のマスト細胞数と c-kit 遺伝子の発現の相互関係を調べることで、c-kit 遺伝子の転写の調節が年齢によっても影響を受けるかどうかを明らかにすることである。

[方法ならびに成績]

1. 胎生18日から生後150日までの正常 (+/+) マウスと W^{sh}/W^{sh} マウスの皮膚切片をアルシアンブルーで染色し、皮膚1cmあたりのマスト細胞数を算定した。+/+マウスの皮膚マスト細胞数は全観察期間を通じてほぼ一定であったのに対して、 W^{sh}/W^{sh} マウスの皮膚のマスト細胞数は胎生18日の時点では同年齢の+/+マウスの約40%であったが、その後は指数関数的に減少し、生後60日の時点では+/+マウスの約6%、生後150日の時点では+/+マウスの約0.6%にまで減少した。
2. W^{sh}/W^{sh} マウス由来の培養マスト細胞は c-kit mRNA をまったく発現していないが W^{sh}/W^{sh} 胎仔の皮膚にはマスト細胞は認められたので、さまざまな年齢の+/+および W^{sh}/W^{sh} マウスの皮膚での c-kit mRNA の発現を RT-PCR サザンハイブリダイゼーション法を用いて調べた。マスト細胞は高親和性 IgE レセプターの β 鎖 (Fc ϵ RI β) と mast cell carboxypeptidase A (MC-CPA) の mRNA を発現していることがわかっている

ため、これらの mRNA をコントロールとして用いた。+/+マウスの皮膚では c-kit, FcεRI β, MC-CPA の mRNA の発現量は生後150日まで変動を認めなかった。一方、 W^{sh}/W^{sh} マウスの胎生18日の皮膚では同年齢の+/+マウスに比べ約10%の c-kit, FcεRI β, MC-CPA mRNA の発現を認めたが、c-kit mRNA は生後5日目に検出できなくなり、FcεRI β, MC-CPA mRNA は生後150日目に検出できなくなった。

3. c-kit mRNA の発現をより定量的に調べるため、RNase プロテクションアッセイを用いて新たに転写される c-kit mRNA について検討した。+/+マウスにおいては c-kit mRNA の発現量は胎生18日と生後5日の皮膚で差はなかった。一方、 W^{sh}/W^{sh} マウスにおいては胎生18日の皮膚では明らかな c-kit mRNA を検出できたが、生後5日の皮膚においては c-kit mRNA はまったく検出できなかった。
4. c-kit mRNA の発現の消失が皮膚マスト細胞の消失よりも早いことを直接的に示すために in situ ハイブリダイゼーション法を用いた。MC-CPA mRNA は+/+マウスと W^{sh}/W^{sh} マウスの両者において胎生18日から生後5日の皮膚に存在するマスト細胞の約80%に発現していた。一方、c-kit mRNA は+/+マウスにおいては全観察期間を通じて約50%のマスト細胞に発現していたが、 W^{sh}/W^{sh} マウスにおいては胎生18日では約6%のマスト細胞にしか発現しておらず、生後5日ではその数は約1%にまで減少した。
5. マスト細胞において c-kit 蛋白を同定するため、c-kit の細胞外ドメインを認識する ACK2ラットモノクローナル抗体を用いてマウス皮膚を免疫組織化学的に蛍光染色した。標本は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。+/+マウス皮膚のマスト細胞は全観察期間を通じて大部分が強い蛍光を示した。一方、胎生18日の W^{sh}/W^{sh} マウスの皮膚にはきわめて弱い蛍光を示すマスト細胞を+/+マウスの約10%認め、生後5日の時点では蛍光強度はさらに減弱しその数も+/+マウスの約2%にまで減少した。

[総括]

W^{sh}/W^{sh} マウスにおいてはマスト細胞における c-kit mRNA の発現が最初に消失し、その後に c-kit 蛋白が検出不能なレベルにまで減少し、最終的にマスト細胞そのものが消失する。すなわち W^{sh}/W^{sh} マウスの加齢にともなうマスト細胞数の減少は、c-kit mRNA の発現停止が原因であると考えられた。別の言い方をすれば c-kit レセプターの正常な発現はマスト細胞の生存に必須であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

山崎大君はマスト細胞の生存における c-kit レセプターの役割についての研究を、 W^{sh}/W^{sh} 突然変異マウスを用いて行った。その結果、1. 胎生18日の W^{sh}/W^{sh} 胎仔の皮膚のマスト細胞数は正常対照(+/+)胎仔の約40%であったが、生後は指数関数的に減少し、生後150日では+/+マウスの0.6%にまで減少すること、2. RNase プロテクションアッセイにより胎生18日の W^{sh}/W^{sh} 胎仔の皮膚においては弱いながらも明らかな c-kit mRNA のシグナルが検出できるが、生後5日の皮膚においては c-kit mRNA のシグナルは検出できないこと、3. in situ ハイブリダイゼーションにより、生後5日の W^{sh}/W^{sh} マウスの皮膚のマスト細胞にはカルボキシペプチダーゼ A の mRNA は発現しているが c-kit の mRNA を発現していないこと、4. 免疫組織化学染色により、胎生18日の W^{sh}/W^{sh} 胎仔の皮膚の方が生後5日の W^{sh}/W^{sh} マウスの皮膚に比べ c-kit 蛋白を含む細胞の数が有意に多いことを示した。本研究によりマスト細胞の生存には c-kit レセプターの正常な発現が必須であることが明らかとなったので、これは学位論文に値すると考えられる。